

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | |
|---|--|---|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/12, C07K 14/475, 16/22 | | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/19477 |
| | | | (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. April 1999 (22.04.99) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06547 (22) Internationales Anmeldedatum: 15. Oktober 1998 (15.10.98) (30) Prioritätsdaten: 197 45 284.1 15. Oktober 1997 (15.10.97) DE 198 13 088.0 25. März 1998 (25.03.98) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STÄNDKER, Ludger [DE/DE]; Dohmeyers Weg 25, D-30625 Hannover (DE). MEYER, Markus [DE/DE]; Heidering 38 a, D-30625 Hannover (DE). MOSTAFAVI, Hossein [-/DE]; Fraunhoferstrasse 8, D-30163 Hannover (DE). OPITZ, Hans-Georg [DE/DE]; Netztal 46, D-69469 Weinheim (DE). KLING, Lothar [DE/DE]; Neckarpromenade 34, D-68167 Mannheim (DE). (74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE). | | (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> | |
| (54) Title: CADHERIN DERIVED GROWTH FACTOR AND THE APPLICATION THEREOF | | | |
| (54) Bezeichnung: CADHERIN DERIVED GROWTH FACTOR UND SEINE VERWENDUNG | | | |
| <div style="display: flex; justify-content: space-around;"><div style="text-align: center;"><p>DOMAIN STRUCTURE OF CADHERINS Domänenstruktur der Cadherine</p><p>Signal-sequenz SIGNAL SEQUENCE</p><p>Cadherin - Wachstumsfaktor-Region CADHERIN GROWTH FACTOR REGION</p></div><div style="text-align: center;"><p>TRANSMEMBRANE REGION</p><p>Transmembran- region</p><p>extrazelluläre Cadherin-Domänen EXTRACELLULAR CADHERIN-DOMAINS</p><p>intrazelluläre Domäne INTRACELLULAR DOMAIN</p></div></div> | | | |
| (57) Abstract | | | |
| <p>A peptide described as a cadherin derived growth factor (CDGF) has a sequence corresponding to a partial sequence of a pre-pro-cadherin, whereby the pre-pro-cadherin contains the domains of signal sequence, pro-sequence, cadherin repeats, transmembrane region and an intracellular domain. The invention is characterized in such a way that the sequence of the peptide comprises the pro-sequence, at least one of the other domains of the pre-pro-cadherin is absent, and the peptide contains cell proliferative, cell productive and/or cell differentiating properties.</p> | | | |

(57) Zusammenfassung

Als Cadherin Derived Growth Factor (CDGF) bezeichnetes Peptid, dessen Sequenz einer Teilsequenz eines Prä-Pro-Cadherins entspricht, wobei das Prä-Pro-Cadherin die Domänen Signalsequenz, Pro-Sequenz, Cadherin repeats, Transmembranregion und intrazelluläre Domäne aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz des Peptides die Pro-Sequenz umfaßt, mindestens eine der anderen Domänen des Prä-Pro-Cadherins fehlt und daß das Peptid zellproliferative, zellprotektive und/oder zelldifferenzierende Eigenschaften aufweist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidshan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |
| EE | Estland | | | | | | |

Cadherin Derived Growth Factor und seine Verwendung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Peptide (Eiweißstoffe) mit zellproliferativen, zelldifferenzierenden und/oder zellprotektiven Eigenschaften, die als Cadherin Derived Growth Factor (CDGF) bezeichnet werden sowie ihre Verwendung.

Aufgabe der Erfindung ist es, Peptide bereitzustellen, die zellproliferativen, zellprotektiven und/oder zelldifferenzierenden Eigenschaften aufweisen.

Gelöst wird die Aufgabe durch als Cadherin Derived Growth Factor (CDGF) bezeichnete Peptide, deren Sequenz einer Teilsequenz eines Prä-Pro-Cadherins entspricht, wobei das Präpro-Cadherin die Domänen Signalsequenz, Pro-Sequenz, Cadherin repeats, Transmembranregion und intrazelluläre Domäne aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz des Peptides die Pro-Sequenz umfaßt, mindestens eine der anderen Domänen des PräproCadherins fehlt und daß das Peptid zellproliferative, zellprotektive und/oder zelldifferenzierende Eigenschaften aufweist.

Die zellproliferative Wirkung läßt sich beispielsweise an primären Osteoblasten aus Rattencalvarien, die zellprotektiven und/oder zelldifferenzierenden Wirkungen an primären Nervenzellkulturen aus Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen bestimmen.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der CDGF ein Fragment des Pro-Cadherins, d.h. des um die Signalsequenz verkürzten Prä-Pro-Cadherins.

- 2 -

Besonders bevorzugt handelt es sich um den N-Terminus des Pro-Cadherins, also den Teil, der bei der Prozessierung des Pro-Cadherins zum Cadherin abgespalten wird, bzw. um ein N- oder C-terminal verkürztes Fragment davon.

Vorzugsweise weist der CDGF keinen Cadherin repeat auf.

Erfindungsgemäß bevorzugte Ausführungsformen sind Peptide mit der Sequenz

Cadherin-1 human (28-154):

CHPGFDAESYTFVPRRHLEGRVLGRVNFCTGRQRTAYFSLDTRFKVGTGCVITVKR-
PLRFHNPQIHFLVYAWDSTYRKFKSTKVTNLNGHHHRPPPHQASVSGIQAELLTFPNSSP-
GLRRQKR

Cadherin-2 human (24-159):

EASGEIALCKTGFPEDVYSAVLSKDVHEGQPLLNVFSNCNGKRKVQYESSEPADFKVD-
EDGMVYAVRSFPLSSEHAKFLIYAQDKETQEKWQKLSLKPTLTEESVKESAEVEEIVF-
PRQFSKHSGLQRQKR

Cadherin-3 human (27-107):

CRAVFREA EVTLEAGGAEQEPGQALGKVFMGQEPALFSTDND DFTVRNGETVQER-
RSLKERNPLKIFPSKRILRRHKR

Cadherin-4 human (21-169):

HNEDLT TRETCKAGFSEDDYTALISQNI LEGEKLLQVKSSCVGTKGTQYETNSMDFKG-
ADGTVFATRELQVPSEQVAFTVTAWDSQTA EKWD AVLVAQTSSPHSGHKPQKGKKVVA-
LDPSPPPKDTLLPWPQHQNANGLRRRKR

Cadherin-5 human (26-47):

AGANPAQRDTHSLLPTHRRQKR

Cadherin-6 human (19-53):

TLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRSKR

Cadherin-6 human (19-51):

TLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRS

Cadherin-8 human:

MLLDLWTPLIILWITLPPCIYMAPMNQSQVLMMSGSPLELNSLGEEQRILNRSKR

Cadherin-B human (Cadherin-11) Precursor (23-53):

FAPERRGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRSKR

Cadherin-B human (Cadherin-11) Precursor (26-51):

ERRGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRS (OB-CDGF)

Cadherin-C human (Cadherin-12)-Brain-Cadherin Precursor (24-54):

QPQPQQTlatePRENVIHLPGQRSHFQRVKR

Cadherin-C human (Cadherin-12)-Brain-Cadherin Precursor (24-52):

QPQPQQTlatePRENVIHLPGQRSHFQRV

Cadherin-D human (Cadherin 13) (23-138):

EDLDCTPGFQQKVFHINQPAEFIEDQSILNLTFSDCKGNDKLRYEVS SPYFKVNSDGG-
LVALRNITAVGKTLFVHARTPHA EFDMAELVIVGGKDISLQDIFKFARTSPVPRQKR-
SVLLLSLFSLACL

Cadherin-F human (Cadherin 14) (22-60):

VPGWRRPTTLYPWRRAPALSRVRRRAWVIPPI SVSENHKR.

Vorzugsweise ist das erfindungsgemäße Protein ein aus dem Menschen erhältliches Protein oder eine natürlich vorkommende humane Variante davon.

Ein Gegenstand der Erfindung ist auch ein neues Protein, das Teile der Aminosäuresequenz von CDGF umfaßt. Die Erfindung betrifft vorzugsweise einen CDGF, welcher die oben dargestellten Aminosäuresequenzen enthält, er kann jedoch auch Varianten dieser Sequenzen enthalten. Unter dem Begriff "Varianten" im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Sequenzen zu verstehen, die durch Substitution, Deletion und/oder Insertion einzelner

- 4 -

Aminosäuren oder kurzer Aminosäureabschnitte sich von den oben dargestellten Aminosäuresequenzen der CDGF unterscheiden.

Unter dem Begriff "Varianten" fallen sowohl natürlich vorkommende allelische Variationen der CDGF sowie durch rekombinante DNA-Technologie (insbesondere durch in vitro-Mutagenese mit Hilfe von chemisch synthetisierten Oligonukleotiden) erzeugte Proteine, die hinsichtlich ihrer biologischen und/oder immunologischen Aktivität den CDGF entsprechen.

Konservative Austausche sind beispielsweise Y für/gegen V, K für/gegen S, A für/gegen S, D für/gegen E, G für/gegen S, R für/gegen Q, R für/gegen A, Q für/gegen K.

Erfindungsgemäß beansprucht werden auch Nukleinsäuren, die für die Peptide oder Derivate codieren oder komplementär zu diesen Nukleinsäuren sind. Bei den Nukleinsäuren kann es sich beispielsweise um DNA, RNA, PNA oder nuclease-resistente Analoga handeln. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eignen sich zur Expression der CDGF in vivo im Sinne einer Gentherapie sowie als Antisensenukleotide zur Verringerung der Expression. Auch Vektoren, die die Nukleinsäuren enthalten sind Gegenstand der Erfindung. Die Vektoren eignen sich insbesondere zur Expression des Peptides in gentechnisch veränderten Organismen.

Desweiteren betrifft die Erfindung Antikörper, die gegen CDGF oder Derivate davon gerichtet sind sowie Antagonisten/Inhibitoren, die gegen CDGF, ein Derivat oder eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren gerichtet sind. Diese Substanzen eignen sich als Arzneimittel zur Behandlung von Zuständen, die mit einer Überexpression der CDGF verbunden sind sowie zum Einsatz in der Diagnostik.

Die erfindungsgemäßen CDGF, Derivate, Verbindungen, Nukleinsäuren, Antikörper und/ oder Antagonisten/Inhibitoren können zusammen mit üblichen Hilfsmitteln als Arzneimittel verwendet werden. Es wird besonders bevorzugt, daß die Arzneimittel in

- 5 -

geeigneten galenischen Zubereitungen zur oralen, bukalen, intravenösen, intramuskulären, intracutanen, intrathekalen, intranasalen, lokal-topischen Anwendung sowie als Aerosol zur transpulmonalen Applikation vorliegen.

Die Menge an zu verabreichendem Arzneimittel beträgt bevorzugt 1 µg bis 1 g pro Darreichungseinheit pro Tag.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel eignen sich zur Behandlung und Prophylaxe von degenerativen sowie metabolischen Erkrankungen des Knochens wie Osteoporose, Osteomalazie und Osteopenie, des Pankreas wie Diabetes mellitus, des Muskels wie Muskeldystrophien, der Gefäße, des zentralen und peripheren Nervensystems wie periphere und zentrale Neuropathien, der Lunge wie Asthma bronchiale, des Magens wie Ulcus, sowie zur Therapie und Prophylaxe von entzündlichen Prozessen, gestörten Entzündungsreaktionen, Tumorerkrankungen, sowie zur Wund- und Knochenheilung.

Das erfindungsgemäße Diagnostikmittel enthält poly- oder monoklonale Antikörper gegen das erfindungsgemäße Peptid, gegebenenfalls in markierter Form, wie in fluoreszenz- oder radioaktiv-markierter Form, um in einem an sich bekannten ELISA oder RIA eingesetzt zu werden. Das erfindungsgemäße Diagnostikmittel enthält DNA, RNA und/oder PNA gegebenenfalls in modifizierter und/oder markierter Form zum Einsatz in dem Fachmann bekannten Testsystemen wie PCR oder Fingerprinting.

Die Diagnostikmittel eignen sich zur Kontrolle von CDGF-Spiegeln in Geweben, in Sekreten und/oder in Körperflüssigkeiten wie Plasma, Urin und Liquor cerebrospinalis sowie als Marker für Funktionsstörungen des Knochens, der Muskeln, der Gefäße, des Nervensystems, der Lymphorgane, des Magen-Darmtraktes, des Immunsystems und von Diabetes sowie inflammatorischen und neoplastischen Prozessen sowie als Marker bei Krebs (Tumormarker).

- 6 -

Die erfindungsgemäßen CDGF und ihre Derivate sind durch Isolierung erhältlich aus Hämofiltrat durch Kationenaustauscher-Extraktion mit nachfolgender Elution der adsorbierten Substanzen, eine erneute Kationenaustauscher-Chromatographie des die Peptide enthaltenden Extraktes sowie mehrstufige Umkehrphasen-Chromatographie. Totalsynthetisch sind die erfindungsgemäßen Peptide durch Festphasensynthese im Sinne der Merrifield-Synthese oder Flüssigphasensynthese nach dem Fachmann an sich bekannten Methoden mit geschützten Aminosäuren und anschließende Aufreinigung erhältlich. Auch durch dem Fachmann an sich bekannte Verfahren der heterologen Expression mittels gängiger biotechnologischer Vektoren lassen sich die erfindungsgemäßen Peptide herstellen.

Beispielsweise wurde ein Peptid, das als OB-CDGF bezeichnet wird, mit chromatographischen Methoden aus humanem Hämofiltrat aufgereinigt und mit Hilfe eines Bioassays identifiziert.

Das Peptid besitzt eine Molekularmasse von 3062.8 Da. Bislang wurde über die Analyse einer cDNA eine OB-Cadherin Prä-Pro-Sequenz postuliert. In dieser aus der cDNA abgeleiteten Sequenz findet sich die erfindungsgemäße Peptidsequenz direkt hinter der putativen Signalsequenz (siehe Figur 1).

Die biochemische Charakterisierung des erfindungsgemäßen Peptides erfolgte durch Massenspektrometrie und Sequenzierung des gesamten Peptides. Die Sequenzanalyse des biologisch aktiven Peptides ergab die folgende Aminosäuresequenz für OB-CDGF:

ERRGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRS

Im ESI (Elektrospray Ionisation)-Massenspektrum des OB-CDGF wurde die Molekularmasse (MW) bestimmt mit:

OB-CDGF, MW 3062.8 Da

- 7 -

Das erfindungsgemäße Peptid ist durch ein Reinigungsverfahren ausgehend von humanem Hämofiltrat erhältlich. Dieses Verfahren gemäß DE 36 33 707, welches die Gewinnung von Eiweißstoffen aus Hämofiltrat offenbart, wurde in einer modifizierten Form durchgeführt.

Hämofiltrat fällt bei der Ultrafiltration des Blutes von Nierenkranken in großen Mengen an. Das humane Hämofiltrat wird gegebenenfalls mit Wasser verdünnt und angesäuert. Der pH-Wert beträgt vorzugsweise 1.5 bis 3.5, insbesondere 2.5 bis 3.0. Danach wird das Hämofiltrat über einen Kationenaustauscher geleitet, beispielsweise einem mit Sulfonsäuregruppen modifizierenden Trägermaterial (Fraktogel SP - 650 (M), Merck, Darmstadt). Die an den Kationenaustauscher gebundenen Peptide werden mit einer relativ hoch konzentrierten Salzlösung eluiert. Die Ionenstärke der Elutionslösung entspricht dabei ungefähr einer 0.5 bis 1 molaren Ammoniumacetatlösung.

Das aufgefangene Eluat wird einer weiteren Kationenaustauscher-Chromatographie unterzogen. Diese Chromatographie ist vorzugsweise eine Stufenelution mit Puffern von ansteigenden pH-Werten.

Die das erfindungsgemäße Peptid enthaltenen Fraktionen werden mittels präparativer Umkehrphasen-Chromatographie und nachfolgender semipräparativer Umkehrphasen-Chromatographie beispielsweise an C4-modifizierten Trägermaterialien weitergereinigt. Der Reinigungsgrad wird vorzugsweise mittels analytischer Umkehrphasen-Chromatographie an C18-modifizierten Trägermaterialien überprüft.

Die durch die chromatographische Reinigung erhaltene Substanz wurde der Strukturaufklärung zugeführt. Die Bestimmung der Molekülmasse des nativen Peptids erfolgte mittels eines Elektrospray-Massenspektrometers. Die Sequenzanalyse erfolgte über einen Edman-Abbau der Peptide sowie von chemisch modifizierten Derivaten mit einem ABI 473 A Sequenzer.

- 8 -

Die Totalsynthese erfolgte an üblichen Festphasen im Sinne der Merrifield-Synthese. Die Synthesestrategie und der Aufbau des Peptids und von ihm abgeleiteten Derivaten mit den entsprechend geschützten Aminosäuren sind dem Fachmann bekannt.

Das erfindungsgemäße OB-CDGF sowie seine cDNA, sein Gen und Analoga, Fragmente und Derivate zu dem Peptid, der cDNA und dem Gen sowie Antikörper, welche die Wirkung des OB-CDGF aufheben, können als Arzneimittel Verwendung finden.

Figur 1 zeigt die Domänenstruktur der Cadherine.

Figur 2 zeigt die Chromatogramme der Isolierung des OB-CDGF aus Hämofiltrat. Die Identifizierung erfolgt durch ein Proliferationsassay an primären Osteoblasten. Einzelheiten der Aufreinigung können dem Beispiel 1 entnommen werden.

Figur 3 zeigt das Elektrospray-Massenspektrum des isolierten OB-CDGF. Aus den zweifach und dreifach protonierten Ionen berechnet sich ein Molekulargewicht vom 3.062 Dalton.

Figur 4 zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurve von chemisch synthetisiertem OB-CDGF auf die Proliferation von primären Knochenzellen. In Figur 4a wird die Wirkung für eine Inkubationszeit von 72 Stunden, in Figur 4b für eine Inkubationszeit von 48 Stunden gezeigt. Gemessen wurde die Aufnahme von Bromdesoxyuridin (BrdU). Der Einbau von BrdU wurde mittels ELISA gemessen.

Figur 5 zeigt die spezifische Bindung von iodmarkiertem OB-CDGF an primäre Osteoblasten (monolayer) und an die Extracellulär Matrix (ecm) von primären Osteoblasten. Dargestellt ist die Verdrängung des markierten OB-CDGF durch nichtmarkiertes OB-CDGF bei steigender Konzentration der Menge an nichtmarkiertem OB-CDGF.

Figur 6 zeigt die Stimulation von primären Osteoblasten durch OB-CDGF Zugabe. Die intracelluläre Calciumkonzentration steigt

- 9 -

durch Zugabe von OB-CDGF an. Gemessen wurde der Calciumgehalt in Gegenwart von Fura 2 an Einzelzellen im Fluoreszenzmikroskop.

Figur 7 ist ein Westernblot, der die intracelluläre MAP-Kinaseaktivität nachweist. Diese Aktivität gilt als Parameter für die Rezeptor- und Calcium-vermittelte Zellantwort auf OB-CDGF an primären Osteoblasten. Die obere Bande (46 kD) zeigt die Konzentration der MAP-Kinase nach Stimulation mit fötalem Kälberserum FCS (links) oder OB-CDGF (rechts) in Abhängigkeit der Inkubationszeit. Die untere Bande zeigt eine interne Kontrolle für den Zellaufschluß/Westernblot.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1

Hämofiltrat-Batch-Extraktion

800 bis 1.000 L Hämofiltrat werden mit HCl auf einen pH -Wert von 2.7 eingestellt und mit Wasser auf eine Leitfähigkeit von 5.5 mS/cm verdünnt und mit einer Flußrate von 3 L/min auf einen starken Kationenaustauscher aufgetragen.

Chromatographiebedingungen:

| | |
|-----------------|--|
| Säule: | Vantage VA 250 (Amicon, Witten) |
| Säulenmaterial: | Fractogel TSK SP 650 (M) , 25 cm x 20 cm |
| Fluß: | 3 L/min |
| Detektion: | 280 nm, pH, Leitfähigkeit |
| Puffer A: | Hämofiltrat pH 2.7, Leitfähigkeit 5.5 mS/cm |
| Puffer B: | 0.5 M Ammoniumacetat |
| Anlage: | Autopilot Chromatographiesystem, (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden) |

Nach Auftrag der insgesamt 1.000 L Flüssigkeit über Nacht wird mit mehreren Säulenvolumina 5 mM HCl gespült. Die Elution der

- 10 -

gebundenen Peptide erfolgt als Batch-Elution mit 0.5 M Ammoniumacetat. Hierbei wird eine komplette Elution der Peptide über steigenden pH-Wert (6.8 - 7.2) und steigende Leitfähigkeit (56 mS/cm) in etwa 5 L Eluat erreicht.

Erste präparative Auftrennung

Die Ammoniumacetat-Eluate der Batch-Extraktion werden in Mengen von 5.000 bis 10.000 L Hämofiltrat-Peptid vereinigt. Nach pH-Einstellung auf pH 2.7 wird der Peptidextrakt unter Zumischung von VE-Wasser mit einer Leitfähigkeit von 5.5 mS/cm auf den präparativen Kationenaustauscher aufgetragen.

Chromatographiebedingungen:

Säule: Vantage 250 VA
 Säulenmaterial: Fractogel TSK SP 650 (M) , 25 cm x 20 cm
 Fluß: bis zu 3 L/min während des Auftrages
 0.5 bis 1 L während der Elution
 Detektion: 280 nm, pH, Leitfähigkeit
 Probe: Hämofiltrat pH 2.7, Leitfähigkeit 5.5 mS/cm
 Anlage: Autopilot Chromatographiesystem,
 (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden)

Nach Auftrag des Rohextraktes über 240 min wird die Säule mit 0.01 M HCl gespült, bis die Leitfähigkeit unter 1 mS/cm ist. Die Elution erfolgt dabei in mehreren Stufen mit den im folgenden angegebenen Puffern

| <u>Puffer</u> <u>(mS/cm)</u> | <u>pH-Wert</u> | <u>Puffersubstanzen</u> | <u>Leitfähigkeit</u> |
|---------------------------------|----------------|---|----------------------|
| Waschpuffer: | 2.0 | 0.01 M HCl | 1 |
| Elutionspuffer 1: | 3.6 | 0.1 M Zitronensäure- 1-hydrat | 2.9 |
| Elutionspuffer 2: | 4.5 | 0.1 M Essigsäure + 0.1 M Natriumacetat | 4.0 |
| Elutionspuffer 3: | 5.0 | 0.1 M Äpfelsäure | 6.2 |
| Elutionspuffer 4: | 5.6 | 0.1 M Bernsteinsäure | 6.1 |

- 11 -

| | | | |
|-------------------|-----|--|-----|
| Elutionspuffer 5: | 6.6 | 0.1 M NaH ₂ PO ₄ | 4.9 |
| Elutionspuffer 6: | 7.4 | 0.1 M NaH ₂ PO ₄ | 6.7 |
| Elutionspuffer 7: | 9.0 | 0.1 M Ammoniumcarbonat | 6.7 |

Die Eluate 1-7 werden als pH-Pool I-VII bezeichnet. Sie werden separat gesammelt. Die Elution erfolgt bis zum Erreichen einer neuen Basislinie, wobei für die einzelnen pH-Pools I bis VII Elutionsvolumina von 10 bis 25 L erreicht werden. Der Chromatogramm ist in Figur 2a gezeigt.

Zweite präparative Auftrennung:

Die einzelnen pH-Pools werden zur Fraktionierung und gleichzeitigen Entsalzung über eine Reversed Phase Chromatographie getrennt

Chromatographiebedingungen:

Säule: FineLine 100 (Pharmacia, Freiburg)
Säulenmaterial: Source RPC, 15 Fm 10 x 12.5 cm (FineLine 100)
Fluß: 150 mL/min (FineLine 100)
Detektion: 280 nm, Leitfähigkeit, pH
Puffer A: 10 mM HCl
Puffer B: 80% Acetonitril in 10 mM HCl
Gradient: 0-60% Puffer B in 5 Säulenvolumen

Nach Auftrag der pH-Pools wird die Säule mit Puffer A gespült. Während der Elution werden Fraktionen zu 200 ml gesammelt. Das Chromatogramm ist in Figur 2 b gezeigt. Aliquots der Fraktionen werden im Bioassay getestet. Die Fraktionen werden gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert.

Semipräparative Reverse-Phase C18-Chromatographie:

Die im Bioassay aktive Fraktion 13 aus pH-Pool VI wurde über eine semipräparative Reverse-Phase Säule aufgetrennt. Die Fraktionen 5-7 enthielten die erfindungsgemäße Substanz.

- 12 -

Chromatographiebedingungen:

Säule: 4,7 cm x 30 cm Stahlsäule

Füllmaterial: Vydac RP-C18 15-20 Fm, 300 Å

Puffer A: 0,1 % TFA

Puffer B: 0,1 % TFA, 80 % Acetonitril

Gradient: 5 - 50% B in 45 min, 50 - 100% B in 10 min

Fluß: 42 ml/min

Detektion: 214 nm und 280 nm

Chromatographieranlage: BioCad

Fraktionen: á 1.5 min ab Start des Gradienten

Das Chromatogramm ist in Figur 2c gezeigt.

Massenbestimmungen

Alle Massenbestimmungen der nativen und synthetischen Peptide wurden auf einem Elektrospray-Massenspektrometer (ESI-MS) durchgeführt. Die Molekülmassen des Peptids wurden entsprechend der oben gezeigten Massenzahlen (MW) bestimmt. Das Massenspektrum ist in Figur 3 gezeigt.

Sequenzbestimmung

Das gereinigte, native und das synthetisch hergestellte Peptid wurde mittels Edman-Abbau auf einem ABI 473 A Sequenzer unter Verwendung des Standard-Programms analysiert. Die Proben werden auf eine Polybrene-Membran in Mengen zwischen 100 und 400 pmol aufgetragen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Massenbestimmungen ergab sich folgende Aminosäuresequenz:

ERRGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRS

Datenbankvergleich

Ein Datenbankvergleich wurde mit Hilfe des HUSAR-Programmpakets an den SwissProt und EMBL-Nukleinsäure Daten-

banken durchgeführt. Die Sequenz entspricht den aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuren des humanen Cadherin-11 Precursors (Osteoblasten Cadherin, Propeptid, Aminosäuren 26-51).

Resynthese

Die Synthese des Peptids mit der Sequenz ERRGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRS wurde nach der Merrifield-Festphasen-Methode ausgehend von geschützten Fmoc-Aminosäuren durchgeführt. Das synthetische Peptid wurde über Umkehrphasen-Chromatographie aufgereinigt. Die Identität und Reinheit der Substanz wurde mit Hilfe von Massenspektrometrie, Sequenzanalyse und Kapillarzonenoelektrophorese nachgewiesen.

Bestimmung der biologischen Aktivität von OB-CDGF (zellproliferativer Effekt)

Die Isolierung des OB-CDGF erfolgte anhand seiner biologischen Aktivität in einem Proliferationsassay der primären Osteoblasten. Dazu wurden jeweils Aliquots der unter Beispiel 1 beschriebenen einzelnen Chromatographiestufen gefriergetrocknet und anschließend dem biologischen Assay zugeführt. Die Fraktionen, die jeweils ein positives Signal ergaben, wurden der weiteren Reinigung unterzogen.

Der Assay mißt die Proliferation der Zellen, nachdem sie in serumfreien Medium mit 1 mg/ml Rinderserumalbumin gehalten wurden, dann die Proben zugegeben wurden und nach weiteren 48 Stunden der Einbau von ^3H -Thymidin oder Bromdeoxyuranosin (BrdU) bestimmt wurde. Als Positiv-Kontrolle wird in diesem Assay knochenwachstumsfördernde Faktoren wie IGF oder Angiotensin oder fötales Kälberserum (FCS) eingesetzt.

Die Experimente wurden in Anlehnung an Pfeilschifter et al., Endocrinology 126, 703, 1990, durchgeführt.

Die Gewinnung von primären Osteoblasten erfolgte durch sequen-

- 14 -

tielle Abdauung mittels Collagenase aus fetalen Rattenkalvari-
en. Dabei wurden 5 Zellfraktionen erhalten. Der Pool aus den
Zellfraktionen 3-5 wurde in vitro kultiviert. Die Kultur der
Zellen erfolgte in einem Inkubator bei einer relativen Luft-
feuchte von 95%, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Temperatur
von 37EC. Die Untersuchungen der Prüfsubstanzen erfolgte in
Kulturen der ersten, zweiten oder dritten Zellpassage.

Für die Untersuchung wurden die Zellen mindestens 95 Stunden
vor Aufgabe der Prüfsubstanzen in einer Zellzahl von 7×10^3 Zel-
len (in 100 µl Kulturmedium) / Well in Mikrotiterplatten (MTP)
mit Rundboden ausgesät. Dabei fand als Kulturmedium MEM Dul-
becco (plus 4,5 g/l Glukose plus 3,7 g/l NaHCO₃ ohne Glutamin)
Verwendung, dem 5% fetales Kälberserum (FKS) und 5000 U/ml Pe-
nicillin/Streptomycin zugesetzt werden.

Unmittelbar vor Zugabe der Prüfsubstanzen zur Zellkultur er-
folgte ein Austausch des Mediums gegen 150 µl Medium, das an-
stelle von FKS 1 mg/ml Rinderserumalbumin (RSA) enthielt.
Prüfsubstanzen wurden in den gewünschten Konzentrationen dem
RSA-haltigen Medium zugesetzt. Als Positivkontrolle wurde TGFβ₁
(Transforming growth factor β₁) in Konzentrationen von 0,1-
0,2 ng/ml mitgeführt. Pro (Positiv-) Kontrolle bzw. Substanz-
konzentration wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die Inkubation der Zellkulturen mit Prüfsubstanzen erfolgte 24
bis 72 Stunden, in den letzten 3 Stunden zusätzlich unter An-
wesenheit der Thymidinsonde (Zugabe von 1 µCi Methyl-³H-
Thymidin/MTP-Vertiefung in 20 µl PBS-Lösung).

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellkulturen 3x mit
0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen und anschließend mit je
100 µl Flüssigszintillator (OptiPhase Supermix[®] der Firma Wal-
lac) versetzt. Im Anschluß daran erfolgte die Vermessung der
in die DNA eingebauten Radioaktivität in einem Flüssigszintil-
lationscounter (1450 MicroBeta[®] der Firma Wallac) in cpm.

- 15 -

Bei der Auswertung dienen Zellkulturen, die ausschließlich RSA-haltiges Medium erhalten hatten, als Kontrollen (100%).

Der OB-CDGF besitzt in dosisabhängiger Weise eine wachstumsfördernde Wirkung auf primäre Osteoblasten (Knochenzellen). Diese biologische Wirkung wurde sowohl für das native als auch für das synthetisch hergestellte Peptid nachgewiesen.

Beispiel 2

Bestimmung der biologischen Aktivität BR-CDGF

Das der CDGF-Region des Cadherin-12 (BR-Cadherin; N-Cadherin-2) entsprechende Peptid mit der Aminosäuresequenz QPQPQQLATEPRENVIHLPGQRSHFQRV, welches nach der Festphasensynthese - wie unter Beispiel 1 für das OB-CDGF beschrieben - synthetisiert wurde, wurde auf seine überlebensfördernde Wirkung auf Primärkulturen von Neuronen aus Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen getestet.

Das Testmodell ist folgendermaßen aufgebaut:

Primäre Nervenzellkulturen aus Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen (Embryonalentwicklung E10)

Die Präparation und Kultivierung erfolgt wie beschrieben von Borasio G.D., John J., Wittinghofer A., Barde Y.-A., Sendtner M. Heumann R. (1989) Neuron 2, 1087-1096. Zur Bestimmung von überlebensfördernden Effekten von Wirkstoffen wird die Bestimmung des zellulären LDH-Gehalts nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden eingesetzt. Hierzu wird das Kulturmedium durch Ausklopfen der Platte entfernt. Nur die vitalen Zellen bleiben am Plattenboden haften und können dann bestimmt werden. Zur Bestimmung des LDH-Gehalts wird der LDH-Zytotoxizitätstestkit von Boehringer Mannheim (BM) eingesetzt.

- 16 -

Die Kulturen werden in 96-Well Mikrotiterplatten als Duplikate eingesetzt. Auf jeder Platte wird eine NGF-Eichkurve mitgeführt und die biologische Aktivität der Substanzen in pg/mL NGF-Äquivalenten ausgedrückt. Als niedermolekulare Referenzsubstanz wird das Staurosporin-Derivat K252a in einer Konzentration von 300 nmol/L mitgeführt.

Das Peptid zeigte in konzentrationsabhängiger Weise eine überlebensfördernde Wirkung auf diese primären Neuronen. Diese Zellen sind typische Nervenzellen, so daß BR-CDGF ein neuroprotektiver Faktor ist.

Beispiel 3

Bestimmung der biologischen Aktivität CAD6-CDGF (zellprotektiver Effekt)

Das der CDGF-Region des Cadherin-6 entsprechende Peptid mit der Aminosäuresequenz TLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRS, welches nach der Festphasensynthese - wie unter Beispiel 1 für das OB-CDGF beschrieben - synthetisiert wurde, wurde auf seine überlebensfördernde Wirkung auf Primärkulturen von Neuronen aus Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen getestet. Das Testmodell ist, wie in Beispiel 2 beschrieben, aufgebaut.

Das Peptid zeigte in konzentrationsabhängiger Weise eine überlebensfördernde Wirkung auf diese primären Neuronen.

Beispiel 4

Bindungsassay von markiertem OB-CDGF an Osteoblasten

Die Bindung der osteoproliferativen Peptide an neonatale Rattenosteoblasten Monoschichten wurde unter Verwendung von ¹²⁵I markierten Peptiden durchgeführt. Die Iodierung erfolgte durch Chloramin T. Die spezifische Aktivität der Peptide beträgt 100.000 cpm/ng. Die Bindungsstudien wurden durchgeführt an

- 17 -

confluenten Schichten sowie der Extracellulär-Matrix einer ersten Passage von neonatalen Rattenosteoblasten. Die Zellen wurden serumhaltigem Medium für 24 Stunden inkubiert und dann vier mal mit PBS gewaschen und in 250 µl des Assaypuffers (20 mM HEPES, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,0) mit 80.000 cpm des iodmarkierten Peptids in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen des unmarkierten Peptids für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Dann wurde der Inkubationspuffer entfernt und die Zellen viermal mit kaltem PBS gewaschen und mit 1 M NaOH solubilisiert. Die zellgebundene Aktivität wurde mit Hilfe eines Gamma-Counters bestimmt. Die entsprechenden Versuchsergebnisse sind in Figur 5 dargestellt. Mit Zunahme der Konzentration an nicht-markiertem OB-CDGF nimmt die Menge an spezifisch gebundenem markierten OB-CDGF ab.

Beispiel 5

Intracelluläre Calciumfreisetzungen in primären Osteoblasten

Die intracelluläre Signalkette für Calcium²⁺ wird an einzelne Osteoblastenzellen gemessen. Die intracelluläre Ca²⁺-Aktivität von primären Osteoblasten wird mit dem Ca²⁺ empfindlichen Farbstoff Fura-2 (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) gemessen. Die primären Osteoblasten werden auf Glasträgern (Durchmesser 30 mm) für ein bis drei Tage kultiviert, die an einer Perfusionskammer eines invertierten Mikroskops (Axiomat IDC-UV, Zeiss, Göttingen, Deutschland) befestigt ist. Die Zellen wurden in einer modifizierten Krebs-Henseleit-Pufferlösung (KHB, Zusammensetzung 145 mM NaCl, 1,6 mM K₂HPO₄, 0,4 mM KH₂PO₄, 1,3 mM Calciumgluconat, 1,0 mM MgCl₂, 5,0 mM D-Glucose, pH 7,4) für 10 min bei 37°C mit 5 µM Fura-2/Acetoxymethylester gelöst in 0,1 g/l Pluronic F-127 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in RPMI 1640 (PAA, Cölbe, Deutschland) inkubiert.

Der Inkubation folgt eine Äquilibrierungsperiode von 10 bis 15 min in der die Zellen mit KHB-Lösung bei 37° mit einer Perfusionsrate von etwa 5 ml/min gespült werden. Die Fura-2-

beladenen primären Osteoblasten werden bei 340, 360, 380 nm mit einem Hochgeschwindigkeitsfilterrad (Rotationsgeschwindigkeit 10 Herz), einem Einzelphotonzählrohr (Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) und einer Xenonquarzlampe (XBO 75 W/OFR, Zeiss, Deutschland) als Licht-/Impulsquelle gemessen. Die Fura-2-Emission wird durch ein Langwellenfilter bei 510 nm mit einer Ultrafluar 125 x Glycerolimmersionslinse gemessen. Alle Messungen werden an einzelnen Zellen durchgeführt. Das Meßfeld wird mittels eines justierbaren Loch mit etwa 8 µm Durchmesser gewählt. Ausgewertet wird das Verhältnis der Photonenemission nach Anregen bei 340 und 380 nm. Die Rohdaten werden auf Autofluoreszenz und Rauschen korrigiert. Der so erhaltene Hintergrundwert wird von den Meßsignalen bei jedem Experiment abgezogen. Die Rohdaten werden berechnet und 10 benachbarte Datenpunkte werden gemittelt, um eine Zeitauflösung von 1 Hz zu erhalten. Die Fluoreszenz bei 360 nm wird verwendet um die Calciumaktivität zu prüfen. Alle Proben werden vor dem Experiment in einem Phosphatpuffer gelöst und wenigstens für 1 bis 2 Minuten gemessen. Die Kalibrierung des Ca^{2+} wird am Ende jedes Experiments durch Inkubation der Zellen mit dem Ca^{2+} -Ionophore, Ionomycin (10 µmol, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in Gegenwart von 1,3 mmol Ca^{2+} bzw. nominaler Abwesenheit (5 mM Ethylen glycol-bis(β-aminoethyl ether), N,N,N',N'-Tetraessigsäure, in Gegenwart von EGTA) gemessen. Nur Kalibrierungen sowohl mit Maximum- als auch Minimumwerten werden für die Bestimmung des Ca^{2+} -Wertes verwendet. Bei den Experimenten, bei denen die doppelte Kalibrierung nicht erfolgreich war, wird der Mittelwert aller Kalibrierung verwendet. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Figur 6 gezeigt.

Beispiel 6

Wie bereits unter Beispiel 5 gezeigt, kann durch die Inkubation mit CDGF eine intrazelluläre Calcium-Freisetzung an primären Osteoblasten induziert werden. Um diese physiologische Antwort näher zu charakterisieren wurde der weitere intrazelluläre Signalweg ("down stream" vom Calcium) untersucht. Eine

- 19 -

mögliche Signaltransduktionskaskade ist die Aktivierung der MAP-Kinase, ein Enzym, das eine wesentliche Rolle bei der Signalvermittlung vom Zytoplasma in den Zellkern spielt. Bei der Weiterleitung des Signals kommt es zu einer Phosphorylierung des Enzyms, das mit einem spezifischen Antikörper detektiert werden kann. Der Nachweis dieses Proteins kann somit im Westernblot erfolgen und stellt ein Maß für die Phosphorylierung wie auch für die Expression aufgrund des Stimulus dar. Primäre Osteoblasten wurden über verschiedene Zeiten mit Cadherin bzw. Kontrollen (FCS) inkubiert. Durch Zugabe des Antikörpers wurde im Westernblot die Expression des Enzyms (MAP-Kinase) in der Zelle nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Figur 7 dargestellt. Es ist deutlich sichtbar, daß ohne einen Stimulus wie FCS oder OB-CDGF keine Expression stattfindet, während nach Stimulation eine deutliche Bande in der erwarteten Größe der MAP-Kinase erscheint (obere Bande). Je länger mit OB-CDGF stimuliert wurde, desto deutlicher wurde die erkennbare Bande. Dies zeigt eindeutig, daß OB-CDGF zu einer Expression der intrazellulären MAP-Kinase führt. Hieraus läßt sich schließen, daß CDGF rezeptorvermittelt über Calcium wirkt und die weitere Signalverarbeitung über die MAP-Kinase verläuft.

Patentansprüche

1. Als Cadherin Derived Growth Factor (CDGF) bezeichnetes Peptid, dessen Sequenz einer Teilsequenz eines Prä-Pro-Cadherins entspricht, wobei das Präpro-Cadherin die Domänen Signalsequenz, Pro-Sequenz, Cadherin repeats, Transmembranregion und intrazelluläre Domäne aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz des Peptides die Pro-Sequenz umfaßt, mindestens eine der anderen Domänen des Präpro-Cadherins fehlt und daß das Peptid zellproliferative, zellprotektive und/oder zelldifferenzierende Eigenschaften aufweist.
2. CDGF gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das CDGF zellproliferativ auf primäre Osteoblasten aus Ratten-calvarien wirkt.
3. CDGF gemäß Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das CDGF zellprotektiv und/oder zelldifferenzierend auf primäre Nervenzellkulturen aus Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen wirkt.
4. CDGF gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der CDGF ein Fragment des Pro-Cadherins ist.
5. CDGF gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um das Peptid handelt, das bei der Prozessierung von Pro-Cadherin zu Cadherin abgespalten wird oder um ein Fragment davon handelt.
6. CDGF gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der CDGF keinen Cadherin repeat aufweist.

7. CDGF mit der Sequenz

Cadherin-1 human (28-154):

CHPGFDAESYTFVPRRHLEGRVLRVNFCTGRQRTAYFSLDTRFKVGTGCVIT-
VKRPLRFHNPQIHFLVYAWDSTYRKFKSTKVTNLNGHHHRPPPHQASVSGIQAELLTFP-
NSSPGLRRQKR

Cadherin-2 human (24-159):

EASGEIALCKTGFPEDVYSAVLSKDVHEGQPLLNVFSNCNGKRKVQYESSEPADF-
KVDEEDGMVYAVRSFPLSSEHAKFLIYAQDKETQEKWQKLSLKPTLTEESVKESAEVE-
EIVFPRQFSKHSGLRQKR

Cadherin-3 human (27-107):

CRAVFREA EVTLEAGGAEQEPGQALGKVFMGQEPALFSTDNDFFTNRNGETVQER-
RSLKERNPLKIFPSKRILRRHKR

Cadherin-4 human (21-169):

HNEDLTRETCKAGFSEDDYTALISQNILEGKLLQVKSSCVGTKGTQYETNSMD-
FKGADGTVFATRELQVPSEQVAFTVTAWDSQTAEKWDAVLVAQTSSPHSGHKPQKGK-
KVVALDPSPPPKDTLLPWPQHQNANGLRRRKR

Cadherin-5 human (26-47):

AGANPAQRDTHSLLPTHRRQKR

Cadherin-6 human (19-53):

TLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRSKR

Cadherin-6 human (19-51):

TLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRS

Cadherin-8 human:

MLLDLWTPLIILWITLPPCIYMAPMNQSQVLMSGSPLELNSLGEEQRILNRSKR

Cadherin-B human (Cadherin-11) Precursor (23-53):

FAPERRGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRSKR

ERRGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRS (OB-CDGF)

Cadherin-C human (Cadherin-12) - Brain-Cadherin Precursor
(24-54):

QPQPQOTLATEPRENVIHLPGQRSHFQRVKR

Cadherin-C human (Cadherin-12) - Brain-Cadherin Precursor
(24-52):

QPQPQOTLATEPRENVIHLPGQRSHFQRV

Cadherin-D human (Cadherin 13) (23-138):

EDLDCTPGFQQKVFHINQPAEFIEDQSILNLTFS DCKGNDKLR YEVS SPYFKVNS-
DGGLVALRNITAVGKTLF VHARTPHAEFDMAELVIVGGKDISLQDIFKFARTSPVPR-
QKRPSVLLLLSLFSLACL

Cadherin-F human (Cadherin 14) (22-60):

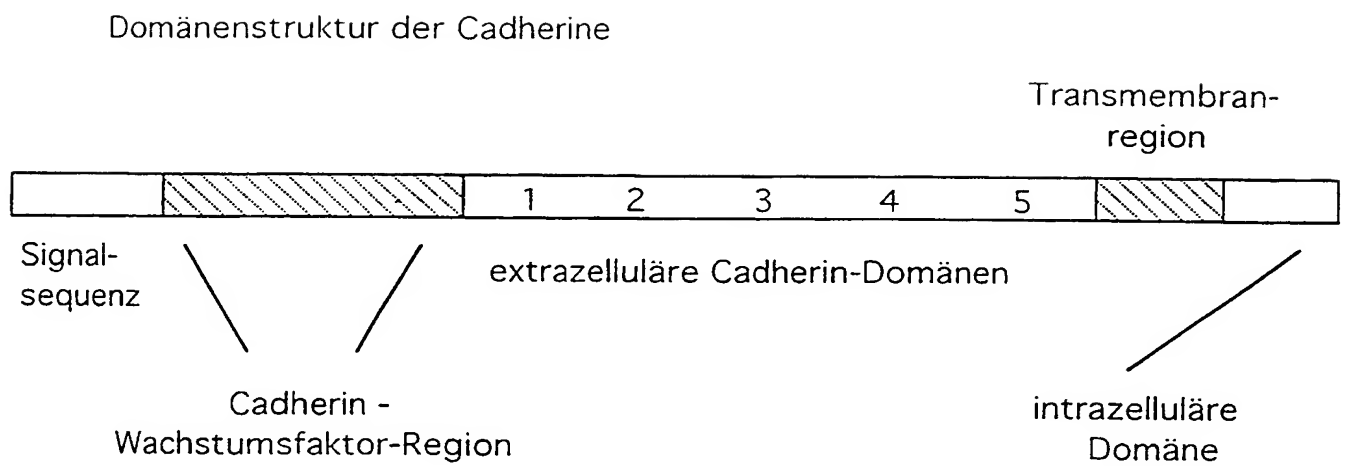
VPGWRRPTTLYPWRRAPALSRVRRRAWVIPPIVSENHKKR

8. Varianten von CDGF, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um allelische Variationen der CDGF oder um durch in-vitro Mutagenese erhältliche Peptide handelt, die in ihrer biologischen und/oder immunologischen Aktivität den CDGF entsprechen.
9. Verbindung dadurch gekennzeichnet, daß sie CDGF oder Derivate gemäß den Ansprüchen 1 bis 8 enthalten und zellproliferative, zellprotektive und/oder Zelldifferenzierende Eigenschaften aufweisen.
10. Nukleinsäuren codierend für CDGF gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, Varianten gemäß Anspruch 8 oder Verbindung gemäß Anspruch 9.
11. Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie komplementär zur Nukleinsäure gemäß Anspruch 10 ist.
12. Nukleinsäure gemäß Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um DNA, RNA, PNA oder nuclease-resistente Analoga davon handelt.

13. Vektoren enthaltend Nukleinsäuren gemäß mindestens einem der Ansprüche 10 bis 12.
14. Antikörper dadurch gekennzeichnet, daß sie gegen CDGF gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, eine Variante gemäß Anspruch 8, eine Verbindung gemäß Anspruch 9 gerichtet sind.
15. Antagonist/Inhibitor dadurch gekennzeichnet, daß er gerichtet ist gegen CDGF gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, eine Variante gemäß Anspruch 8, eine Verbindung gemäß Anspruch 9 oder gegen eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12.
16. Arzneimittel enthaltend CDGF gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, eine Variante gemäß Anspruch 8, Verbindungen gemäß Anspruch 9, Nukleinsäuren gemäß mindestens einem der Ansprüche 10 bis 12, Antikörper gemäß Anspruch 14 und/oder Antagonisten/Inhibitoren gemäß Anspruch 15 zusammen mit üblichen Hilfsmitteln.
17. Diagnostikmittel enthaltend CDGF gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, eine Variante gemäß Anspruch 8, Verbindung gemäß Anspruch 9, Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 10 bis 12, Antikörper gemäß Anspruch 14 und/oder Antagonisten/Inhibitoren gemäß Anspruch 15 zusammen mit üblichen Hilfsmitteln.
18. Arzneimittel gemäß Anspruch 16 in geeigneten galenischen Zubereitungen zur oralen, intravenösen, intramuskulären, intracutanen, intrathekalen Anwendung sowie als Aerosol zur transpulmonalen Applikation.
19. Verwendung der Arzneimittel gemäß Anspruch 16 oder 18 zur Behandlung und Prophylaxe von degenerativen sowie metabolischen Erkrankungen des Knochens wie Osteoporose, Osteomalazie und Osteopenie, des Pankreas wie Diabetes mellitus, des Muskels wie Muskeldystrophien, der Gefäße, des zentralen und peripheren Nervensystems wie periphere und

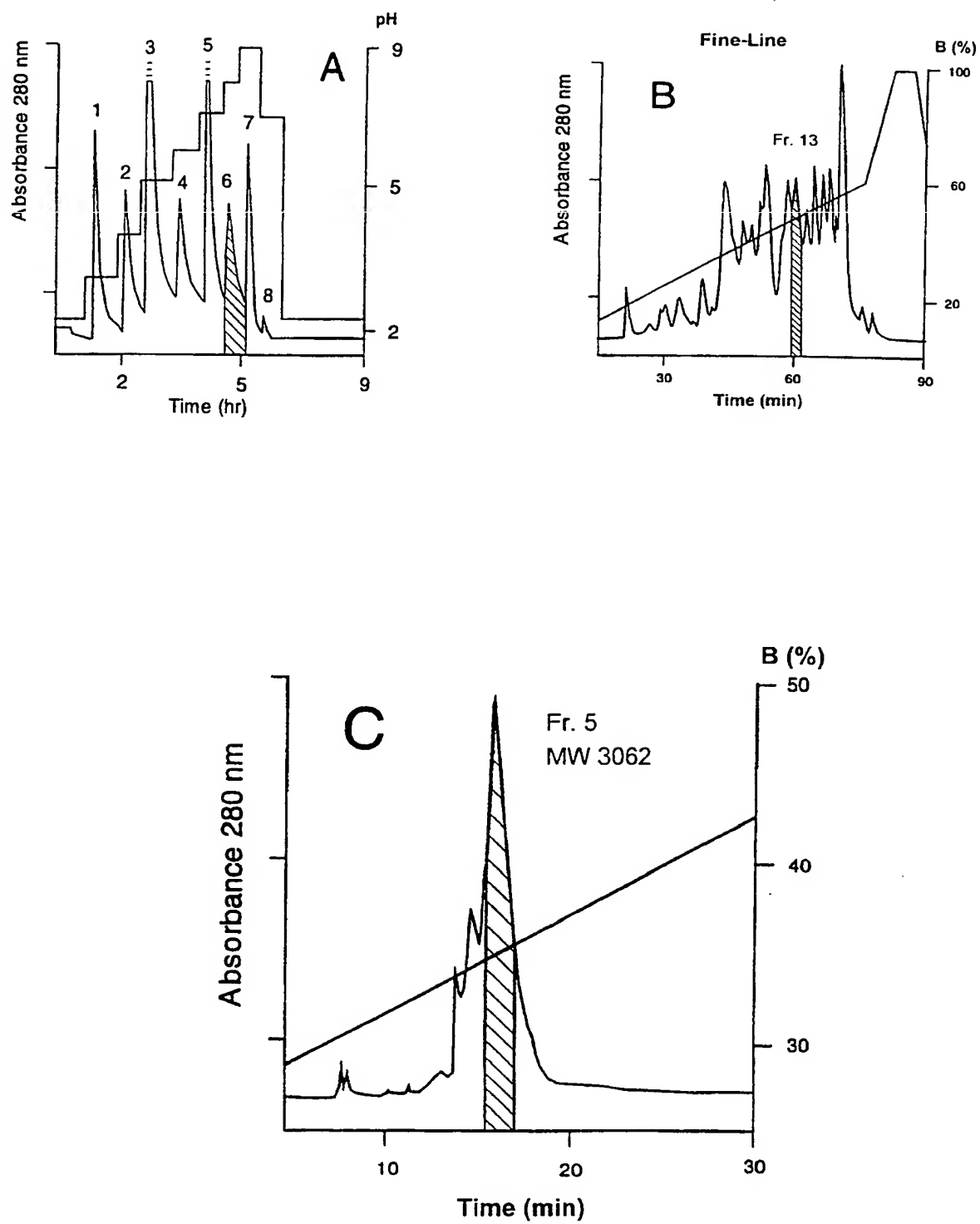
zentrale Neuropathien, der Lunge wie Asthma bronchiale, des Magens wie Ulcus, sowie zur Therapie und Prophylaxe von entzündlichen Prozessen, gestörten Entzündungsreaktionen, Tumorerkrankungen, sowie zur Wund- und Knochenheilung.

20. Verwendung des Diagnostikmittels gemäß Anspruch 17 zur Kontrolle von CDGF-Spiegeln in Geweben, in Sekreten und/oder in Körperflüssigkeiten wie Plasma, Urin und Liquor cerebrospinalis.
21. Verwendung des Diagnostikmittels gemäß Anspruch 17 als Marker für Funktionsstörungen des Knochens, der Muskeln, der Gefäße, des Nervensystems, der Lymphorgane, des Magen-Darmtraktes, des Immunsystems und von Diabetes sowie inflammatorischen und neoplastischen Prozessen sowie als Tumormarker.
22. Verfahren zur Herstellung von CDGF oder gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, Varianten gemäß Anspruch 8 oder Verbindung gemäß Anspruch 9 aus Hämofiltrat
 - durch Kationenaustauscher-Extraktion mit nachfolgender Elution der adsorbierten Substanzen, eine erneute Kationenaustauscher-Chromatographie des die Peptide enthaltenden Extraktes sowie mehrstufige Umkehrphasen-Chromatographie oder
 - durch Festphasensynthese im Sinne der Merrifield-Synthese sowie Flüssigphasensynthese nach dem Fachmann an sich bekannten Methoden mit geschützten Aminosäuren und Aufreinigung oder
 - durch dem Fachmann an sich bekannte Verfahren der heterologen Expression mittels gängiger biotechnologischer Vektoren.



Figur 1

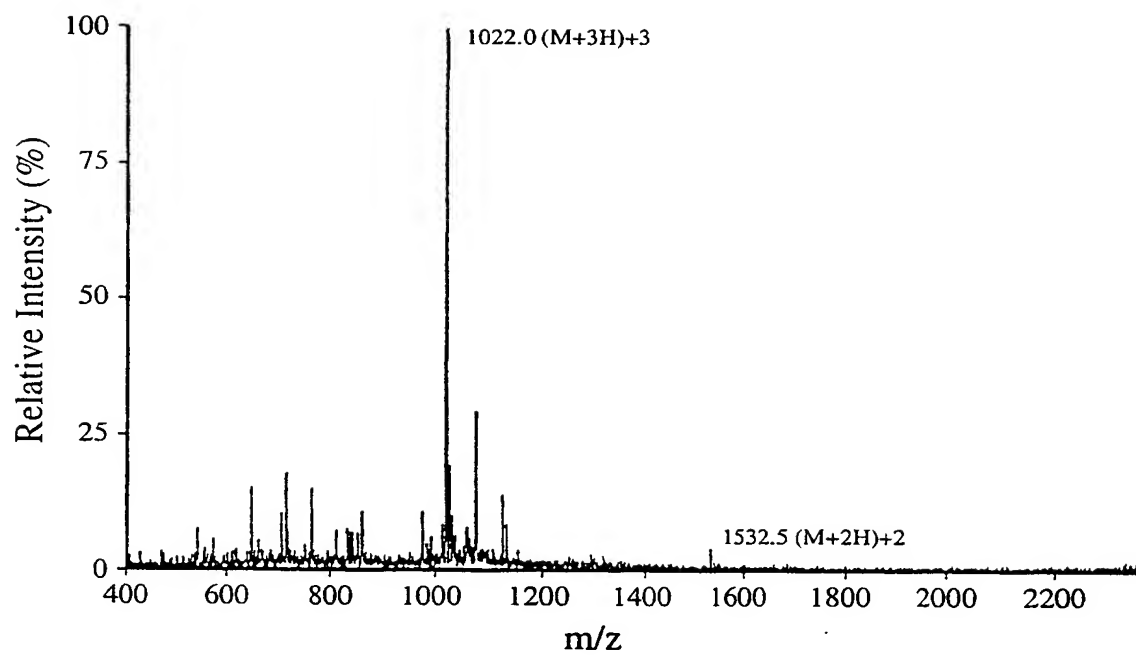
2/7



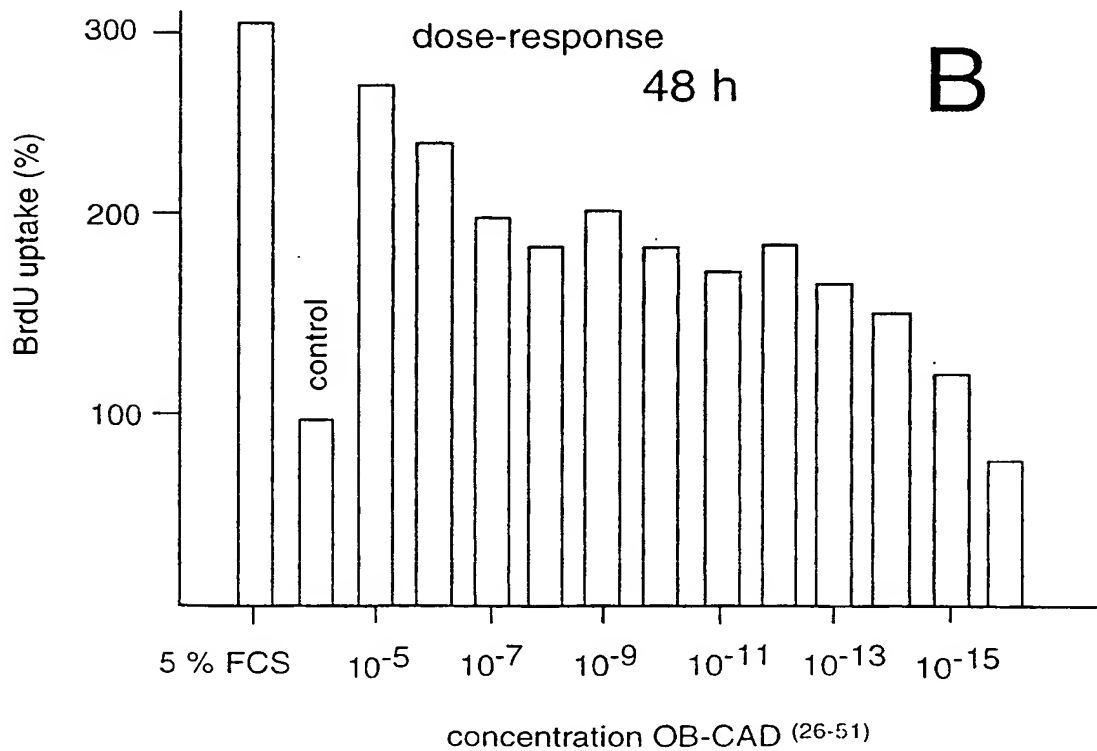
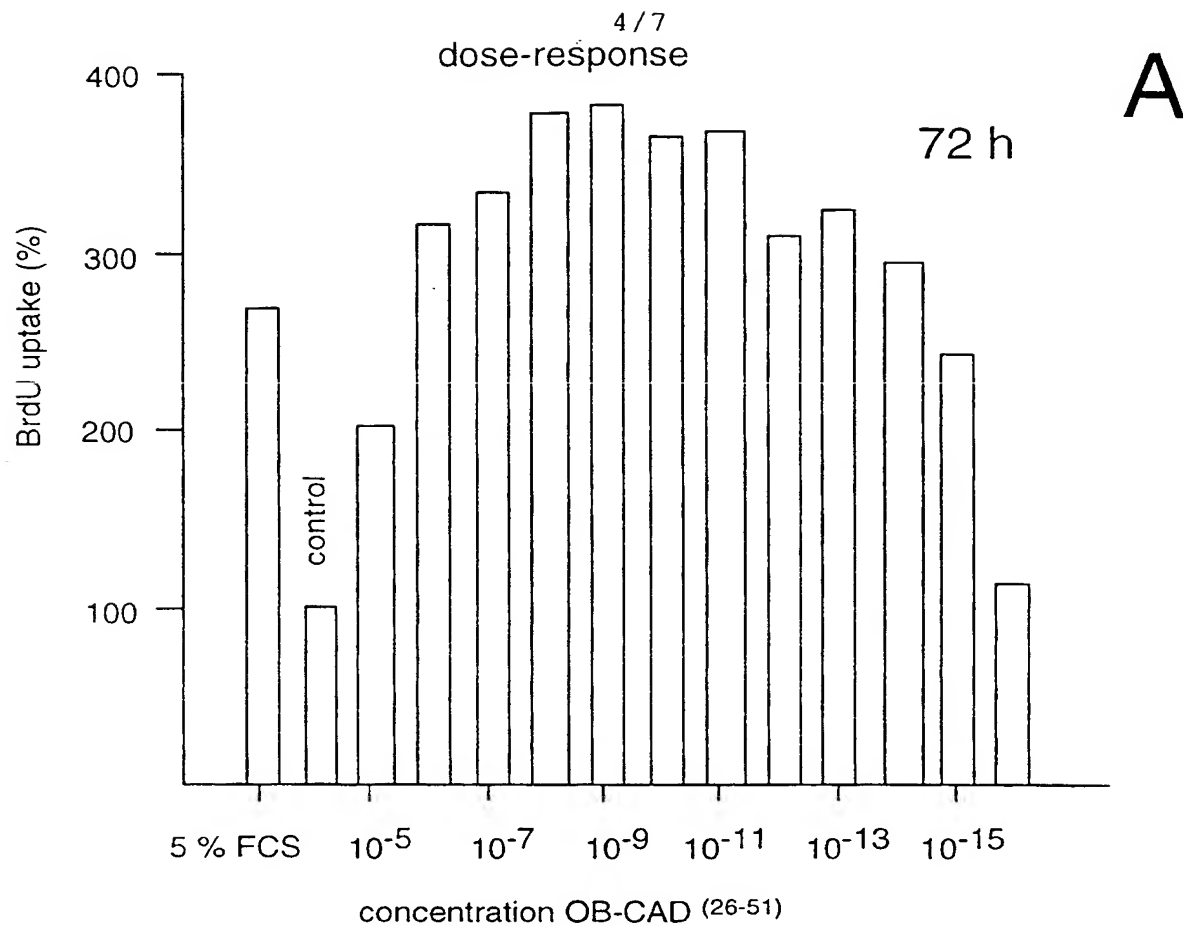
Figur 2

ERSATZBLATT (REGEL 26)

3/7

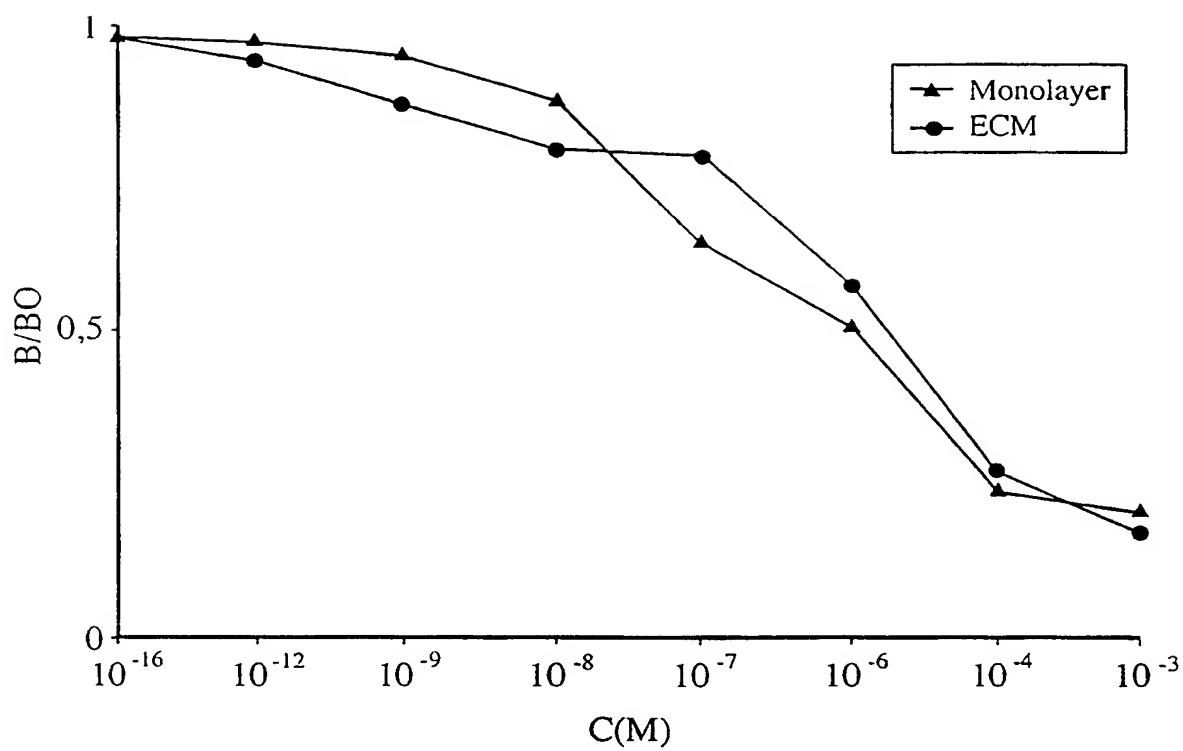


Figur 3



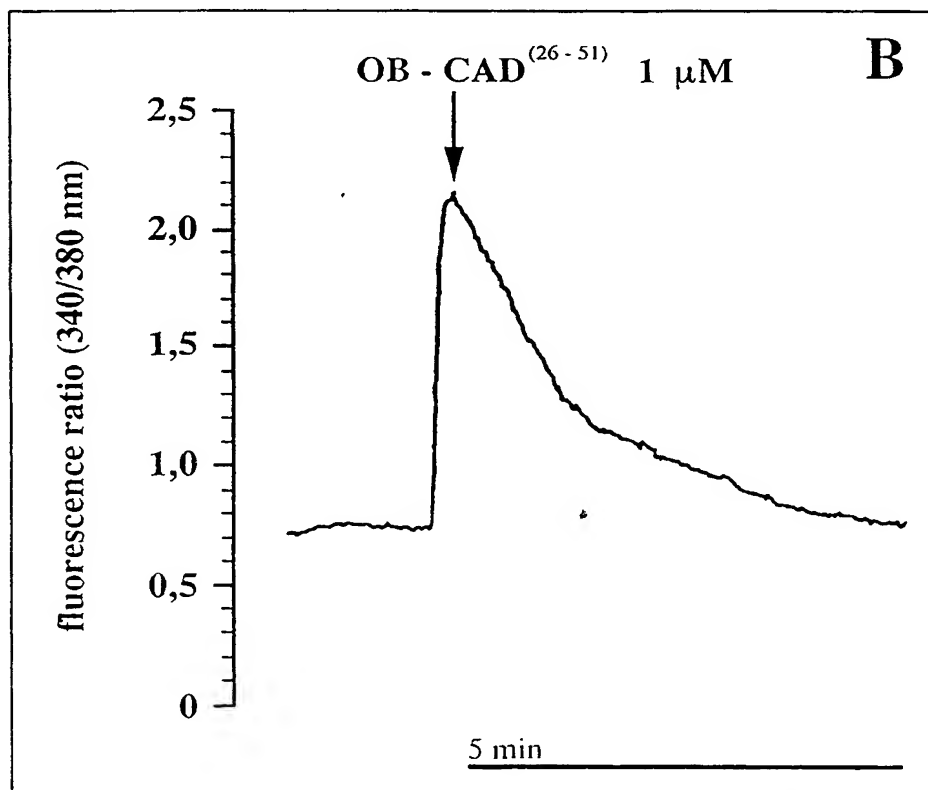
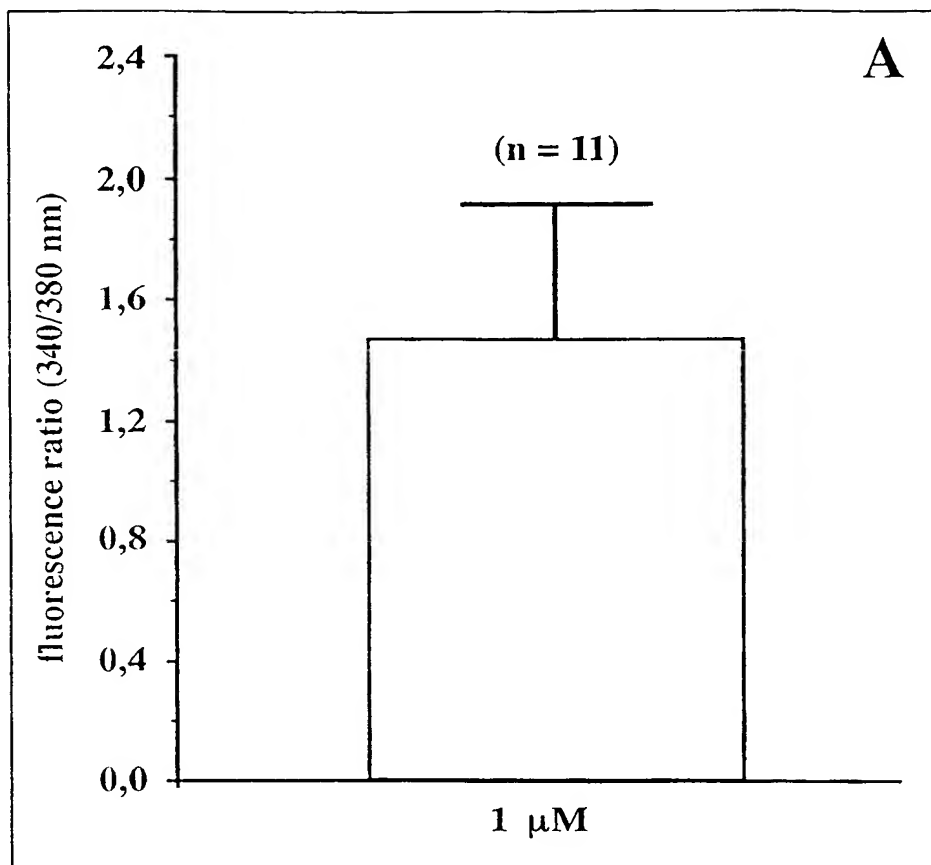
Figur 4

ERSATZBLATT (REGEL 26)

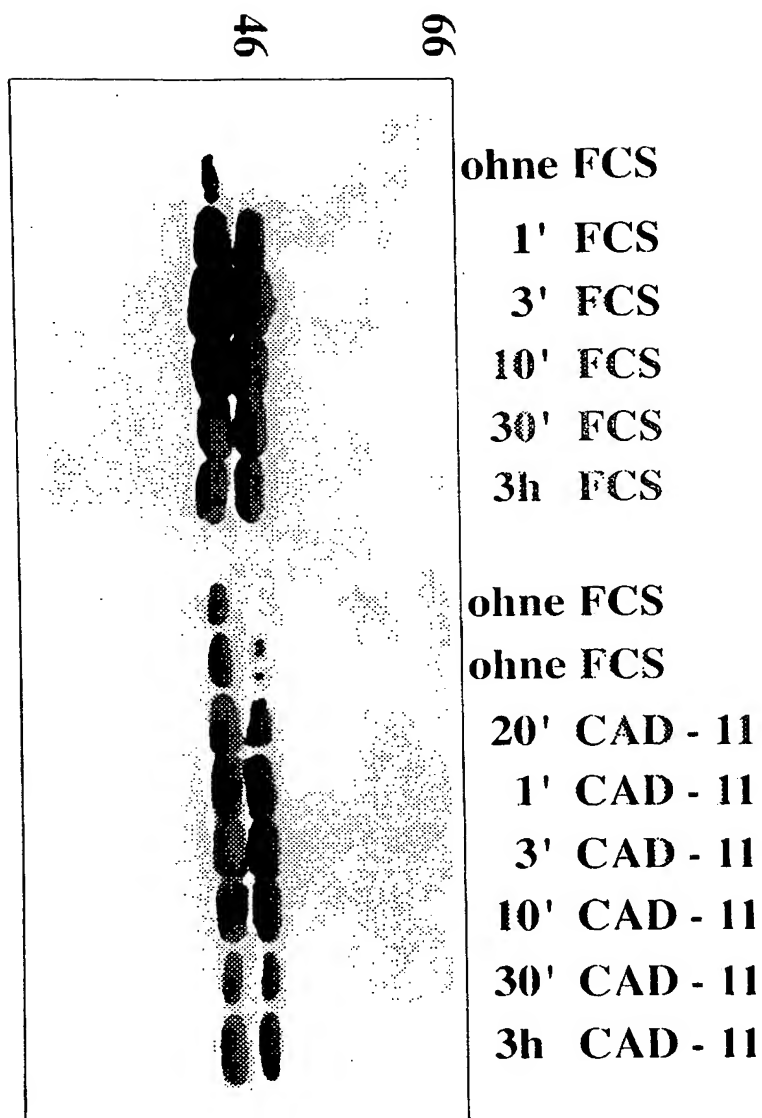


Figur 5

6 / 7



Figur 6
ERSATZBLATT (REGEL 26)



Figur 7

Glu Ile Val Phe Pro Arg Gln Phe Ser Lys His Ser Gly His Leu Gln
115 120 125

Arg Gln Lys Arg
130

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 78 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Cys Arg Ala Val Phe Arg Glu Ala Glu Val Thr Leu Glu Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ala Glu Gln Glu Pro Gly Gln Ala Leu Gly Lys Val Phe Met Gly Gln
20 25 30

Glu Pro Ala Leu Phe Ser Thr Asp Asn Asp Asp Phe Thr Val Arg Asn
35 40 45

Gly Glu Thr Val Gln Glu Arg Arg Ser Leu Lys Glu Arg Asn Pro Leu
50 55 60

Lys Ile Phe Pro Ser Lys Arg Ile Leu Arg Arg His Lys Arg
65 70 75

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 144 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

His Asn Glu Asp Leu Thr Thr Arg Glu Thr Cys Lys Ala Gly Phe Ser
1 5 10 15

Glu Asp Asp Tyr Thr Ala Leu Ile Ser Gln Asn Ile Leu Glu Gly Glu
20 25 30

Lys Leu Leu Gln Val Lys Ser Ser Cys Val Gly Thr Lys Gly Thr Gln
35 40 45

Tyr Glu Thr Asn Ser Met Asp Phe Lys Gly Ala Asp Gly Thr Val Phe
50 55 60

Ala Thr Arg Glu Leu Gln Val Pro Ser Glu Gln Val Ala Phe Thr Val
65 70 75 80

Thr Ala Trp Asp Ser Gln Thr Ala Glu Lys Trp Asp Ala Val Leu Val
85 90 95

Ala Gln Thr Ser Ser Pro His Ser Gly His Lys Pro Gln Lys Gly Lys
100 105 110

Lys Val Val Ala Leu Asp Pro Ser Pro Pro Pro Lys Asp Thr Leu Leu
115 120 125

Pro Trp Pro Gln His Gln Asn Ala Asn Gly Leu Arg Arg Arg Lys Arg
130 135 140

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 22 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Ala Gly Ala Asn Pro Ala Gln Arg Asp Thr His Ser Leu Leu Pro Thr
1 5 10 15

His Arg Arg Gln Lys Arg
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 35 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Thr Leu Ser Thr Pro Leu Ser Lys Arg Thr Ser Gly Phe Pro Ala Lys
1 5 10 15

Lys Arg Ala Leu Glu Leu Ser Gly Asn Ser Lys Asn Glu Leu Asn Arg
20 25 30

Ser Lys Arg
35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Thr Leu Ser Thr Pro Leu Ser Lys Arg Thr Ser Gly Phe Pro Ala Lys
1 5 10 15

Lys Arg Ala Leu Glu Leu Ser Gly Asn Ser Lys Asn Glu Leu Asn Arg
20 25 30

Ser

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 54 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met Leu Leu Asp Leu Trp Thr Pro Leu Ile Ile Leu Trp Ile Thr Leu
1 5 10 15

Pro Pro Cys Ile Tyr Met Ala Pro Met Asn Gln Ser Gln Val Leu Met
20 25 30

Ser Gly Ser Pro Leu Glu Leu Asn Ser Leu Gly Glu Glu Gln Arg Ile
35 40 45

Leu Asn Arg Ser Lys Arg
50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 31 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Phe Ala Pro Glu Arg Arg Gly His Leu Arg Pro Ser Phe His Gly His
1 5 10 15

Gln Pro Gln Pro Gln Gln Thr Leu Ala Thr Glu Pro Arg Glu Asn Val
 1 5 10 15

Ile His Leu Pro Gly Gln Arg Ser His Phe Gln Arg Val
 20 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 129 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Glu Asp Leu Asp Cys Thr Pro Gly Phe Gln Gln Lys Val Phe His Ile
 1 5 10 15

Asn Gln Pro Ala Glu Phe Ile Glu Asp Gln Ser Ile Leu Asn Leu Thr
 20 25 30

Phe Ser Asp Cys Lys Gly Asn Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Val Ser Ser
 35 40 45

Pro Tyr Phe Lys Val Asn Ser Asp Gly Gly Leu Val Ala Leu Arg Asn
 50 55 60

Ile Thr Ala Val Gly Lys Thr Leu Phe Val His Ala Arg Thr Pro His
 65 70 75 80

Ala Glu Phe Asp Met Ala Glu Leu Val Ile Val Gly Gly Lys Asp Ile
 85 90 95

Ser Leu Gln Asp Ile Phe Lys Phe Ala Arg Thr Ser Pro Val Pro Arg
 100 105 110

Gln Lys Arg Pro Ser Val Leu Leu Leu Ser Leu Phe Ser Leu Ala Cys
 115 120 125

Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 39 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Val Pro Gly Trp Arg Arg Pro Thr Thr Leu Tyr Pro Trp Arg Arg Ala
1 5 10 15 .

Pro Ala Leu Ser Arg Val Arg Arg Ala Trp Val Ile Pro Pro Ile Ser
20 25 30

Val Ser Glu Asn His Lys Arg
35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/06547

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C07K14/475 C07K16/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A | US 5 646 250 A (SUZUKI S) 8 July 1997 see examples 2,3 --- | 1-3, 10-15 |
| A | EP 0 585 801 A (HOECHST JAPAN LIMITED) 9 March 1994 see examples 5-7; table 1 --- | 1,2,7, 10-15 |
| A | HIDENOBU TANIHARA ET AL: "Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin" CELL ADHESION AND COMMUNICATION, vol. 2, 1 January 1994, pages 15-26, XP000576845 see figures 1-7 --- -/-- | 1-3,7, 10-15 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 March 1999

Date of mailing of the international search report

16/03/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cupido, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/06547

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|--------------------------|
| A | <p>SELIG S ET AL: "Molecular characterization of Br-cadherin, a developmentally regulated brain-specific cadherin"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA.,</p> <p>vol. 94, no. 6, 18 March 1997, pages 2398-2403, XP002095155</p> <p>WASHINGTON US</p> <p>see page 2399, left-hand column, paragraph 3-5</p> <p style="text-align: center;">-----</p> | <p>1,3,</p> <p>10-15</p> |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/06547

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

For further information, see form PCT/ISA/210

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP98/06547

Although claim 19 relates to a method for treating the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the composition.

Although claims 20 and 21 relate to a method of diagnosis which is carried out on the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/06547

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 5646250 A | 08-07-1997 | US 5597725 A | 28-01-1997 |
| | | CA 2111573 A | 28-10-1993 |
| | | EP 0604603 A | 06-07-1994 |
| | | JP 7500019 T | 05-01-1995 |
| | | WO 9321302 A | 28-10-1993 |
| | | US 5639634 A | 17-06-1997 |
| EP 585801 A | 09-03-1994 | AU 663216 B | 28-09-1995 |
| | | AU 4492293 A | 03-03-1994 |
| | | CA 2104997 A | 01-03-1994 |
| | | JP 6122700 A | 06-05-1994 |
| | | US 5869638 A | 09-02-1999 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06547

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/12 C07K14/475 C07K16/22

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| A | US 5 646 250 A (SUZUKI S) 8. Juli 1997 siehe Beispiele 2,3 --- | 1-3, 10-15 |
| A | EP 0 585 801 A (HOECHST JAPAN LIMITED) 9. März 1994 siehe Beispiele 5-7; Tabelle 1 --- | 1,2,7, 10-15 |
| A | HIDENOBU TANIHARA ET AL: "Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin" CELL ADHESION AND COMMUNICATION, Bd. 2, 1. Januar 1994, Seiten 15-26, XP000576845 siehe Abbildungen 1-7 --- -/- | 1-3,7, 10-15 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. März 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16/03/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cupido, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06547

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------------|
| A | <p>SELIG S ET AL: "Molecular characterization of Br-cadherin, a developmentally regulated brain-specific cadherin"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA.,</p> <p>Bd. 94, Nr. 6, 18. März 1997, Seiten 2398-2403, XP002095155</p> <p>WASHINGTON US</p> <p>siehe Seite 2399, linke Spalte, Absatz 3-5</p> <p>-----</p> | <p>1,3,</p> <p>10-15</p> |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06547

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Für weitere Auskünfte siehe Formblatt PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 98 06547

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Obwohl Anspruch 19 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Zusammensetzung.

Obwohl die Ansprüche 20 und 21 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Zusammensetzung.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06547

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | | Datum der Veröffentlichung |
|--|---|-------------------------------|-----------------------------------|-----------|-------------------------------|
| US 5646250 | A | 08-07-1997 | US | 5597725 A | 28-01-1997 |
| | | | CA | 2111573 A | 28-10-1993 |
| | | | EP | 0604603 A | 06-07-1994 |
| | | | JP | 7500019 T | 05-01-1995 |
| | | | WO | 9321302 A | 28-10-1993 |
| | | | US | 5639634 A | 17-06-1997 |
| EP 585801 | A | 09-03-1994 | AU | 663216 B | 28-09-1995 |
| | | | AU | 4492293 A | 03-03-1994 |
| | | | CA | 2104997 A | 01-03-1994 |
| | | | JP | 6122700 A | 06-05-1994 |
| | | | US | 5869638 A | 09-02-1999 |